

(E)



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ **Offenlegungsschrift**
⑯ **DE 197 21 211 A 1**

⑯ Int. Cl. 6:
A 61 K 45/06
A 61 K 31/70
A 61 K 31/40
A 61 K 51/00

⑯ Aktenzeichen: 197 21 211.5
⑯ Anmeldetag: 21. 5. 97
⑯ Offenlegungstag: 26. 11. 98

⑯ Anmelder:

Lindner, sen., Wolfgang, Dr.med., 91710
Gunzenhausen, DE

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gem. Paragraph 43 Abs. 1 Satz PatG ist gestellt

⑯ Kombination von antientzündlichen Wirkstoffen mit immunstimulierenden Agentien und zytotoxischen Agentien zur Behandlung von Tumoren

⑯ Die Erfindung betrifft eine Methode zur Behandlung von Tumoren mittels einer Dreifachkombinationstherapie. Die einzelnen Komponenten dieser Dreifachkombinationstherapie bestehen aus einer antientzündlichen Therapiekomponente (z. B. Indometacin, Diclofenac, Dexamethason), einer das Immunsystem stimulierenden Therapiekomponente (z. B.: Interleukin-2) und einer den Tumor schädigenden Therapiekomponente (z. B.: Zytostatika/zytotoxische Stoffe, radioaktive Strahlung oder Überwärmungstherapie).

197 21 211 A 1

DE 197 21 211 A 1

DE 197 21 211 A 1

Beschreibung

Einleitung

5 Bei nahezu jedem klinisch apparenten Tumor läßt sich eine Infiltration von Zellen des Immunsystems und insbesondere von Lymphozyten nachweisen (8, 12, 13, 14, 15). In invitro Versuchsanträgen wurde gezeigt, daß diese tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) spezifisch Tumorzellen erkennen und zerstören können (8, 13). Bei den meisten Patienten mit Tumoren, kann man aus dem peripheren Blut Lymphozyten oder auch sogenannte natürliche Killerzellen (NK) isolieren, welche in invitro Testsystemen die Potenz besitzen spezifisch Tumoren zu erkennen und zu zerstören (8, 13, 14).

10 Mit diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß anscheinend gegen jeden Tumor auch eine gegen diesen Tumor gerichtete Immunreaktion vorhanden ist. Aus ungeklärten Gründen ist es jedoch in der Klinik nur in wenigen Fällen und mit geringer Erfolgsquote möglich, eine gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion hervorzurufen, welche auch zu einem therapeutischen Erfolg führt (7, 12, 13, 14, 15).

15 Vorteile der Immuntherapie von Tumoren

Spezifisch gegen den Tumor gerichtete Immunreaktionen bieten prinzipiell die Möglichkeit spezifisch den Tumor unter Schonung des gesunden Gewebes zu eliminieren. Hierdurch werden die Nachteile chirurgischer, radiologischer oder chemotherapeutischer Eingriffe vermieden, welche immer auch gesundes Gewebe in Mitleidenschaft ziehen. Eine spezifische Antitumorreaktion des Immunsystems erscheint daher insbesondere bei bisher inkurablen/inoperablen Tumoren (z. B. Metastasierung, zu große Ausdehnung, lebenswichtige sensible Organe in direkter Tumorumgebung) die einzige therapeutisch sinnvolle Interventionsmöglichkeit zu sein.

25 Bisherige immuntherapeutische Behandlungskonzepte

25 Daher hat es bisher nicht an Versuchen gemangelt, diese spezifischen Antitumorreaktionen von Lymphozyten und NK-Zellen auszunützen, um eine Elimination des Tumors zu bewirken. Hierzu wurde entweder das Immunsystem des Krebskranken direkt stimuliert (z. B. durch intravenöse Gabe von Interleukin-2 oder Interferon-gamma) oder aus dem Tumor bzw. dem peripheren Blut des Krebskranken Zellen des Immunsystems isoliert und in Vitro vermehrt. Diese Zellen des Immunsystems, mit einer nachweisbaren spezifische Antitumoreaktivität wurden anschließend dem Patienten wieder infundiert (13, 14). Die Erwartungen, welche an die Immuntherapieversuche gestellt wurden sind fast alle nicht erfüllt worden. Entweder es wurden keine oder nur geringfügige Therapieeffekte erzielt. Eine der wenigen Ausnahmen stellt die Therapie des Nierenkarzinoms mit Interleukin-2 dar. In diesem Fall erhält man aber auch nur Response-Raten von maximal 30% und kurative Therapieergebnisse in 5 bis 10% der Behandlungsfälle (7). Daher gibt es bisher noch keinen immuntherapeutischen Versuchsansatz, welcher eine befriedigende klinische Wirkung zeigt.

30 Aufgrund dieser mangelhaften klinischen Ergebnisse, gibt es Anstrengungen durch eine Kombination der Immuntherapie mit einem chirurgischen Eingriff, einer Radio- oder Chemotherapie die Wirksamkeit zu steigern (1, 2). In geeigneten Modellsystemen kann tierexperimentell die Wirksamkeit einer Immuntherapie durch Kombination mit einer Strahlen- oder Chemotherapie entscheidend gesteigert werden (7). Leider zeichnet sich auch bei diesen Kombinationstherapien ab, daß die erwarteten Therapieergebnisse in der Klinik ausbleiben (7).

Problemstellung

45 Das Problem besteht in einer bisher fehlenden Therapiemethode zur Behandlung von Krebserkrankungen, welche sowohl eine zuverlässige Wirksamkeit als auch eine gute Verträglichkeit besitzt.

Weg zur Problemlösung

50 Im Rahmen einer Bestrahlungstherapie bzw. einer Chemotherapie werden entzündliche Reaktionen beobachtet (11). Diese entzündlichen Reaktionen können zu einer Steigerung der gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion führen. In unseren eigenen experimentellen Untersuchungen wollten wir aufklären in wie weit entzündliche Prozesse, welche im Rahmen von Bestrahlungstherapien und Chemotherapien auftreten zu einer Steigerung der Wirkung von immunstimulatorischen Substanzen beitragen. Da Interleukin-2 in der Klinik bei der Behandlung des Nierenkarzinoms eine gewisse therapeutische Wirkung zeigt, wurde bei unseren Untersuchungen Interleukin-2 als Stellvertreter der heterogenen Gruppe der immunstimulierenden Substanzen ausgewählt. Bei unseren Untersuchungen setzten wir zuerst den antientzündlichen Wirkstoff Indometacin und später noch weitere Antiphlogistika wie, Aspirin, Diclofenac, Dexamethason, Naproxen, Piroxicam und Ibuprofen ein. Da sowohl Zytostatika als auch die Bestrahlungstherapie mehr oder minder spezifische Noxen für Tumoren darstellen, untersuchten wir zusätzlich, ob sich die Noxe Hyperthermie ebenso für die Kombination mit antientzündlichen Substanzen und Stimulatoren des Immunsystems zur Behandlung von Tumoren eignet.

55 60 Die Ausgangsannahme war, daß die synergistischen Effekte von immunstimulierender Therapie und Bestrahlungs-, Hyperthermie bzw. Chemotherapie durch Gabe von Indometacin reduziert werden.

Problemlösung und experimentelle Befunde

65 Zu unserer Überraschung wurde die antitumorale Wirkung einer kombinierten Chemo-Immuntherapie bzw. Strahlen-Immuntherapie durch die Kombination mit verschiedenen Antiphlogistika um ein vielfaches potenziert. Ein weiterer überraschender Befund stellt dar, daß die von uns verwendete Dreifachkombinationstherapie selbst noch bei geringen Strahlendosierungen bzw. Zytostatikadosierungen eine sehr gute Wirkung zeigte (Anhang: Beispiele 4, 10).

DE 197 21 211 A 1

Im Gegensatz hierzu zeigten die zweifach Kombinationstherapien und Monotherapien, selbst bei wesentlich höheren Strahlendosierungen, kaum eine Wirkung.

Entsprechend unseren Untersuchungen eignet sich auch die Hyperthermie für die Kombinationstherapie mit antientzündlichen Substanzen (z. B. Indometacin) und Immunstimulanzien (z. B. Interleukin-2) (Anhang: Beispiel 11).

Wurde mit der Antiphlogistikatherapie erst kurz vor der Bestrahlungstherapie oder nach der Bestrahlungstherapie begonnen, so konnten keine bzw. nur wesentlich reduzierte synergistische Effekte beobachtet werden (Anhang: Beispiel 5). Wurden die Antiphlogistika jedoch über einen Zeitraum von 3 Tagen vor der Bestrahlung gegeben und einen Tag vor der Bestrahlung abgesetzt, so waren noch deutliche synergistische Effekte zu beobachten (Anhang: Beispiel 5). Da die verwendeten Antiphlogistika nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzen (16), kann bei unseren Untersuchungen die gleichzeitige Gabe von Antiphlogistika und Interleukin-2 keine Bedeutung für die beobachteten Wirkungen besitzen. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß die Antiphlogistika nicht direkt zu einer Steigerung der Effektivität der Radio-Immuntherapie führen, sondern daß sich durch die Gabe von Antiphlogistika Veränderungen ergeben, welche erst die Wirksamkeit der Immuntherapie in Kombination mit der Strahlentherapie ermöglichen. Eine alleinige Kombination der Immuntherapie mit der Gabe von Antiphlogistika hatte keine therapeutischen Effekte, ebenso hatte eine Radio (Chemo-, Hyperthermie) Immuntherapie alleine keine therapeutischen Effekte (Anhang: Beispiele 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12). Eine Kombination der Radio-Immuntherapie mit Antiphlogistika, welche erst ab der Bestrahlung gegeben wurden, zeigte auch keine Verbesserung des therapeutischen Ergebnisses (Anhang Beispiel 5). Dies weist darauf hin, daß durch die Vorbehandlung mit antientzündlichen Substanzen eine Situation geschaffen wird, in der die synergistischen Effekte einer Radioimmuntherapie erst entstehen können. Entsprechendes wurde von uns für die Kombinationstherapie von Zytostatika mit antientzündlichen Substanzen und Immunstimulanten gezeigt (Anhang: Beispiel 10).

Vorteile der neuen Dreifach-Kombinationstherapie

Tumoren, welche mit einer Chemo-, Hyperthermie- oder Bestrahlungstherapie als Monotherapie und in der zweifach Kombinationstherapie mit Immunstimulanten oder antientzündlichen Medikamenten nicht behandelbar sind, können mit der neuen Dreifachkombinationstherapie erfolgreich behandelt werden. Die Behandlungserfolge stellen sich bereits bei niedrigen Strahlen- bzw. Chemotherapiedosen ein. Daher ist mit weniger Nebenwirkungen im Vergleich mit einer hochdosierten Strahlen- bzw. Chemotherapie zu rechnen.

Stand der Technik und Vergleich mit den eigenen Untersuchungsergebnissen

Der Stand der Technik bei der Immuntherapie von Tumoren besteht in der Monotherapie mit immunstimulatorischen Substanzen sowie der Kombination immunstimulierender Substanzen mit der chirurgischen Entfernung, der Bestrahlung, der Hyperthermie und der chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren (1, 2, 3). Weiterhin werden in der Klinik experimentelle Therapien durchgeführt, bei denen ex vivo aktivierte und vermehrte Immunabwehrzellen des Krebspatienten, dem Patienten reinfundiert werden. Zusätzlich zu diesen reinfundierten Zellen erhalten diese Patienten eine Behandlung mit immunstimulatorischen Substanzen (12, 13, 14).

Eine Kombination von Interleukin 2 mit dem Antiphlogistikum Indometacin wurde bereits beschrieben (4). Bei der beschriebenen Wirkung handelt es sich jedoch entsprechend der Literatur um eine Synergismus von Interleukin-2 mit der durch Indometacin unterdrückten Prostaglandinsynthese. Hierbei wurde Interleukin-2 gleichzeitig mit Indometacin gegeben (4). Bei unseren Untersuchungen war jedoch der positive synergistische Effekt noch zu beobachten als die Antiphlogistikatherapie bereits einen Tag vor der Bestrahlung beendet wurde und mit der Gabe von Interleukin-2 erst nach der Bestrahlung begonnen wurde (Anhang Beispiel 5). Da bei unseren Versuchen während der Gabe von Interleukin-2 kein Antiphlogistikum gegeben wurde handelt es sich bei den von uns beschriebenen Effekten nicht um eine direkte Interaktion zwischen dem Antiphlogistikum (Prostaglandinsynthaseinhibitor) Indometacin und Interleukin-2 wie unter (4) beschrieben, sondern um eine Beeinflussung des Tumors vor der Strahlentherapie, wodurch der Tumor nach der Strahlentherapie für eine gegen den Tumor gerichteten Immuntherapie sensibel wird.

Die Vorteile der Kombination einer Strahlentherapie mit einer Interleukin-2 Behandlung wurden bereits in der Literatur beschrieben (6, 9). Die Vorteilhafte Wirkung wurde hierbei auf eine Zunahme der Antigenität des Tumors und einem verlangsamten Tumorwachstum zurückgeführt (9). Unsere Experimente zeigten jedoch keinerlei Wirksamkeit der Zweifachkombination Bestrahlung und Gabe von Interleukin-2 (Anhang: Beispiel 2). Erst wenn vor der Strahlentherapie ein Antiphlogistikum gegeben wurde, zeigten sich positive Antitumoreffekte (Anhang: Beispiel 4, 5). Hieraus ist ersichtlich, daß die in der Literatur beschriebenen Mechanismen der Synergie der Strahlentherapie mit einer immunstimulatorischen Therapie keine Bedeutung für die von uns beobachteten Therapieerfolge besitzen.

Bei den bereits beschriebenen positiven Interaktionen von Zytostatika mit einer Immuntherapie wird der positive Effekt der Kombination auf eine Verminderung der immunsuppressiven Effekte der zytostatischen Therapie durch Immunstimulanten zurückgeführt (2). Bei unseren Untersuchungen wurden die positiven Effekte der Gabe von Interleukin-2 erst nach der Vorbehandlung mit dem Antiphlogistikum Indometacin beobachtet (Anhang: Beispiel 10). Eine durch die Bestrahlungstherapie bzw. Zytostatikatherapie hervorgerufene Immunsuppression müßte auch ohne die Vorbehandlung mit Antiphlogistika durch die Gabe von Interleukin-2 antagonierbar sein. Trotzdem konnten wir in unseren Untersuchungen durch alleinige Bestrahlung und Immunstimulation mittels Interleukin-2 keine Wirkung feststellen (Anhang Beispiel 2, 3). Daher sind die von uns beobachteten Wirkungen der Kombinationstherapie nicht auf die bereits beschriebenen Effekte einer Kombination von Zytostatika mit Immunstimulanten zurückzuführen. Wie im Anhang Beispiel 8 ausgeführt, kann der Immunstimulator Interleukin-2 auch durch andere immunstimulierende Prinzipien, wie z. B. dem bakteriellen Lipopolysacharide aus E. Coli, ersetzt werden.

Generell ist festzustellen, daß die Dreifachkombinationstherapie selbst bei etablierten Tumoren, gezeigt bis Tag 17 nach Tumorapplikation, noch wirksam ist (Anhang Beispiel 7). Zweifachkombinationstherapien oder Monotherapien sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr wirksam, selbst am Tag 10 nach der Tumorinjektion zeigen diese keine Wirkung

DE 197 21 211 A 1

mehr (Anhang Beispiele 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12).

Insgesamt ist festzustellen, daß die vorteilhafte Wirksamkeit der Dreifachkombination von antiphlogistisch wirkenden Medikamenten mit immunstimulierenden Substanzen und einer Bestrahlungstherapie, Hyperthermie bzw. einer Chemotherapie in Form einer Dreifachkombinationstherapie noch nicht beschrieben wurde.

5

Gegenstand der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist eine Kombination von antientzündlich wirkenden Substanzen mit einer das Immunsystem stimulierenden Therapiekomponente und einer den Tumor schädigenden Therapiekomponente. Wesentlich für den 10 Gegenstand der Erfindung ist ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Beginn der einzelnen Therapiekomponenten: Mit der Gabe der antientzündlichen Wirkstoffe ist vor Beginn der den Tumor schädigenden Therapiekomponente zu beginnen. Die Gabe der antientzündlichen Wirkstoffe kann nach erfolgter, den Tumor schädigenden Therapiekomponente fortgesetzt werden. Die Anwendung der immunstimulierenden Therapiekomponente muß spätestens nach der Applikation der tumorschädigenden Therapiekomponente erfolgen. Mit der immunstimulierenden Therapiekomponente kann 15 aber bereits vor Einleitung der den tumorschädigenden Therapiekomponente begonnen werden.

Bei der antiinflammatorischen Wirkstoffen kann es sich um nachfolgend genannte oder ähnliche antientzündliche Substanzen handeln: Indometacin, Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Dexamethason, Ibuprofen, Naproxen, Salicylsäure, Mefenaminsäure, Flufenaminsäure, Fenoprofen, Metamizol, Phenazon, Aminophenazon, Propyphenazon, Phenylbutazon, Oxyphenbutazon, Kortikoid, antientzündliche Zytokine wie z. B. Interleukin-10 und TGF- β , lösliche Interleukin-1 20 Rezeptoren, Interleukin-1 Rezeptorantagonisten, Interleukin-1-Convertingenzyminhibitoren, NF κ B-Inhibitoren und weitere Stoffe mit einer antientzündlichen Wirkung.

Bei der immunstimulatorischen Therapiekomponente kann es sich um eine der nachfolgend genannten oder ähnliche das Immunsystem stimulierende Therapieprinzipien handeln: z. B. Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-12, Interferon- α , Interferon β , Interferon- γ , TNF- α , Impfstoffe, Präparationen von bakteriellen, vira 25 len oder sonstigen Erregern, Concanavalin A, Antikörper zur Aktivierung von Zellen des Immunsystems, Lektine, Pyrogene, immunstimulierende Protein und/oder Kohlenhydratsequenzen, von Extern zugeführte Zellen mit einer immunstimulierenden Wirkung.

Bei den Tumor schädigenden Therapiekomponente kann es sich um eine der nachfolgend genannten oder ähnliche Therapieprinzipien handeln: Cyclophosphamid, Chlorambucil, Melphalan, Busulfan, Thiotepa, Ifosfamid, Methotrexat, 30 5-Fluoruracil, Mercaptopurin, Vinblastin, Vincristin, Etoposid, Teniposid, Doxorubicin, Daunorubicin, Dactinomycin und weitere zytotoxisch und zytostatisch wirkende Substanzen, Applikation dieser den Tumor schädigenden Agentien mittels Methoden welche die selektive Freisetzung dieser Substanzen im Tumor erlauben, Strahlentherapie des Tumors mittels α -, β -, γ - oder sonstiger den Tumor schädigenden Strahlung, lokal Tumor spezifische Überwärmungstherapie, systemische Überwärmungstherapie.

35 Unter diese Erfindung fallen ausdrücklich keine Monotherapien oder Zweifachkombinationstherapien, der zuvor beschriebenen einzelnen Therapiekomponenten.

Literatur

- 40 1. Brivio F., Lissoni, Alderi G., Barni S., Lavorato F., Fumagalli L.; Preoperative interleukin-2 subcutaneous immunotherapy may prolong the survival time in advanced colorectal cancer patients. *Oncology* 53: 263-268 (1996);
2. Lumsden A. J., Codde J. P., Gray B. N., Van der Meide P. H.; Improved Efficacy of Doxorubicin by simultaneous treatment with Interferon- γ and interleukin-2; *in vivo* 6: 553-558 (1992);
3. Morabito F., Callea I., Rodino A., Messina G., Callea V., Iacopino P., Nobile F., Brugiatelli M.; Modulation of purine analogs- and chlorambucil-induced zytotoxicity by alpha-interferon and interleukin-2 in chronic lymphocytic leukemia; *Leukemia* 9: 1450-1455 (1995);
4. Tanaka N., Okamoto Y., Gotoh K., Hizuta A., Yunoki S., Orita K.; Combined therapy with Interleukin 2 and Indomethacin in mice inoculated with MHI34 hepatoma; *Acta Med. Okayama* 49: 241-245 (1995);
5. Lala P. K., Parher R. S.; Cure of B16F10 melanoma lung metastasis in mice by chronic indomethacin therapy combined with repeated rounds of interleukin 2: Characteristics of killer cells generated in situ. *Cancer Res.* 48: 1072-1079 (1988);
6. Cameron R. B., Spiess P. J., Rosenberg S. A.; Synergistic antitumor activity of tumorinfiltrating lymphocytes, interleukin 2 and local tumor irradiation; *J. Exp. Med.* 171: 249-263 (1990);
7. Heaton K. M., Grunm E. A.; Zytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review; *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 213-219 (1993);
8. Lotzova E., Savary C. A., Freedman R. S., Edwards C. L., Morris M.; Comparison of recombinant-interleukin-2-activated peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes of patients with epithelial ovarian carcinoma: zytotoxicity, growth kinetics and phenotype; *Cancer Immunol. Immunother.* 31: 169-175 (1990);
9. Younes E., Haas G. P., Dezso B., Ali E., Maughan R. L., Kukuruga M. A., Montecillo E., Pontes J. E., Hillman G. G.; Local tumor irradiation augments the response to IL-2 therapy in a murine renal adenocarcinoma; *Cellular Immunology* 165: 243-251 (1995);
10. Ashley M. P., Kotlarski I.; In vivo zytotoxic responses induced by allogeneic normal and neoplastic cells in mice: relative lack of immunogenicity of B16 melanoma cells. *Cellular Immunology* 101: 156-167 (1986);
11. Hallahan D., Kuchibhotla J., Wyble C.; Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium; *Cancer Research* 56: 5150-5155 (1996);
12. Rubbert A., Manger B., Lang N., Kalden J. R., Platzer E.; Functional characterization of tumor-infiltrating lymphocytes, lymph-node lymphocytes and peripheral-blood lymphocytes from patients with breast cancer; *Int. J. Cancer* 49: 25-31 (1991);

DE 197 21 211 A 1

13. Aruga A., Yamauchi K., Takasaki K., Furukawa T., Hanyu F.; Induction of autologous Tumor-specific cytotoxic T cells in patients with liver cancer. Characterizations and clinical utilization; *Int. J. Cancer* 49: 19-24 (1991);
14. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul S. E., Leitman A. E., Chang S. E., Ettinghausen Y. L., Matory J. M., Skibber E., Shiloni J. T., Vetto C. A., Seipp C., Simpson C., Reichert C. M.; Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer; *N. Engl. J. Med.* 313: 1485-1492 (1985);
15. Koyama S., Katashi F.; Phenotypic analysis of nylon-wool-adherent suppressor cells that inhibit the effector process of tumor cell lysis by lymphokine-activated killer cells in patients with advanced gastric carcinoma; *J. Cancer Res. Oncol.* 120: 240-247 (1994);
16. Jurna I., in: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, editors W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke; BI Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich Seite 220, (1993);
17. Robins H. I., Sielaff K. M., Hawkins M. J., Borden E. C.; Phase I trial of human lymphoblastoid interferon with whole body hyperthermia in advanced cancer; *Cancer Research* 49: 1609-1615 (1989);
18. Papa M. Z., Mule J. J., Rosenberg S. A.; Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: Successful immunotherapy immunotherapy of established pulmonary metastases from weakly immunogenic and nonimmunogenic murine tumors of three distinct histological types; *Cancer Research* 46: 4973-4978 (1986).

Anhang

20

Beispiele, welche die Erfindung belegen

Material und Methoden

25

Tiere

4 bis 6 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden in Gruppen von 5 Tieren pro Käfig gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Maus-Futter. Die Haltung erfolgte unter SPF Bedingungen und unter 12 stündigem Tag-Nacht Zyklus.

30

Tumoren

Das B16 Melanom (10) und das MCA 105 Sarcom (18), ein Methylcholantren induziertes Sarcom, wurden subkutan in C57BL/6 Mäusen passagiert (syngenes System). Aus diesen soliden Tumoren wurde durch Digestion mit 0,4 mg/ml Collagenase Typ IV (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.) in RPMI 1640 Nährmedium eine Einzelzellsuspension erhalten, welche zusätzlich 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml Gentamycin und 10 mM HEPES Puffer enthielt. Diese Suspension wurde durch ein feinmaschiges Drahtnetz passagiert und mit "Hanks'balanced solution" (HBSS) gewaschen. Die Zahl der vitalen Zellen wurde mittels der Eosin-Färbetechnik bestimmt. Für die *in vivo* Untersuchungen wurde die Zahl der vitalen Zellen auf 2×10^5 /ml in HBSS eingestellt. 0,5 ml entsprechend 10^5 Zellen wurden den C57BL/6 Mäusen über die Schwanzvene injiziert.

35

40

Therapiemethoden

45

Die Strahlentherapie erfolgte mittels einer Co-60 γ -Strahlenquelle. Die Intensität der Strahlenquelle betrug 83 rad/ Minute. Vor der Bestrahlung wurden die Tiere mittels Rompun-Ketavet narkotisiert und entsprechend der vorberechneten Zeit der Strahlenquelle ausgesetzt.

46

Zur Übererwärmungstherapie (Hyperthermie) wurden die Mäuse mit 50 mg/kg Nembutal narkotisiert, und für 30 Minuten in 50 ml Zentrifugenröhren in einem Wasserbad einer Temperatur von 41°C ausgesetzt.

50

Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Dexamethason, Indometacin, Ibuprofen, Piroxicam und Naproxen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) wurden in 1% Carboxymethylcellulose aufgelöst und über eine Schlundsonde appliziert.

51

Bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) aus *Escherichia Coli* (Sigma) wurde in 0,9% NaCl Lösung aufgenommen. Es wurde eine Stammlösung hergestellt und der biologische Effekt auf C57BL/6 Mäuse getestet. Zur therapeutischen Anwendung kam eine 1 : 20 Verdünnung der LD 50 Dosierung. Die Applikation erfolgte i. v.; Recombinantes humanes Interleukin-2 (Chiron) wurde in 0,9% Kochsalzlösung verdünnt und 2 x täglich in einer Dosierung von 100 000 Units verabreicht. Doxorubicin, Methotrexat und Cyclophosphamide (Sigma) wurden in 0,9% Kochsalzlösung aufgenommen und in die Schwanzvene injiziert.

55

Beobachtungsparameter

60

Als Therapieerfolgsparameter dient die Überlebenszeit der Tiere. Nach Beendigung des Experiments oder nach dem Tod der Tiere, wurde eine Sektion durchgeführt um die Todesursache festzustellen (Tumor oder sonstige Ursachen).

61

Statistik

65

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Untersuchungsergebnisse diente der Students T-Test. Zur statistischen Auswertung wurde bei Tieren, welche bis zum Ende des Versuches überlebten, eine der Beobachtungszeit entsprechende Überlebenszeit gesetzt.

DE 197 21 211 A 1

Beispiel 1

Einfluß unterschiedlicher Strahlendosen auf die Entwicklung des B16 Melanoms:
 Ergebnis: Die Überlebenszeit der B16 tragenden Tiere wird durch eine alleinige Suahientherapie nicht verlängert.

5

Tab. 1a

10	Gruppe	Gruppen- größe	Interleukin-2	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit- punkt	Indometacin	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
15	I	5	-	0	-	100000
20	II	5	-	100 / Tag 10	-	100000
25	III	5	-	250 / Tag 10	-	100000
30	IV	5	-	500 / Tag 10	-	100000
35	V	5	-	750 / Tag 10	-	100000
40	VI	5	-	1000 / Tag 10	-	100000

Tab. 1b

30

35	Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
40	I	24;25;27;26;25;	25,4 \pm 1,0	
45	II	24;25;26;27;27;	25,8 \pm 1,2	p>0,05
50	III	24;26;27;28;24;	25,8 \pm 1,6	p>0,05
55	IV	28;27;26;24;28;	26,6 \pm 1,5	p>0,05
60	V	25;27;27;24;29;	26,4 \pm 1,8	p>0,05
65	VI	17;23;19;22;20;	20,2 \pm 2,1	p> 0,01

Beispiel 2

Einfluß der Kombination von Interleukin-2 (2x täglich 100 000 U/kg) mit einer Strahlentherapie auf das B16 Melanom

55

Ergebnis

Die Kombination der Strahlentherapie mit der Gabe von Interleukin-2 hat keinen Einfluß auf das Überleben von B16 Melanom tragenden Mäusen.

60

65

DE 197 21 211 A 1

Tab. 2a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 1000000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	5	Tag 11 bis 17	0	-	100000
II	5	Tag 11 bis 17	100 / Tag 10	-	100000
III	5	Tag 11 bis 17	250 / Tag 10	-	100000
IV	5	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	-	100000
V	5	Tag 11 bis 17	750 / Tag 10	-	100000
VI	5	Tag 11 bis 17	1000 / Tag 10	-	100000

5

10

15

20

Tab. 2b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	24, 24, 27, 27, 24	25,2 \pm 1,5	
II	25, 25, 24, 27, 27	25,6 \pm 1,2	p>0.05
III	24, 23, 28, 26, 24	25,0 \pm 1,8	p>0.05
IV	25, 23, 26, 24, 28	25,2 \pm 1,7	p>0.05
V	24, 24, 25, 27, 26	25,2 \pm 1,2	p>0.05
VI	22, 18, 19, 19, 20	19,6 \pm 1,4	p<0.005

25

30

35

40

Beispiel 3

Einfluß der Kombination von Indometacin (4 mg/kg/Tag) (Tag 5–11) mit der Strahlentherapie auf die Entwicklung des B16 Melanoms. 45

Ergebnis

Weder Strahlentherapie noch die Kombination der Strahlentherapie mit 4 mg/kg Indometacin zeigen eine signifikante 50 Wirkung auf die Entwicklung des B16 Melanoms;

55

60

65

DE 197 21 211 A 1

Tab. 3a

Gruppe	Gruppengröße	Interleukin-2 [IU/Tag]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin [4mg/kg]	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	5	-	0	Tag 5 - Tag 11	100000
II	5	-	100 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
III	5	-	250 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
IV	5	-	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
V	5	-	750 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	5	-	1000 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000

Tab. 3b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	23, 25, 24, 27, 25	24,8 \pm 1,3	
II	24, 26, 24, 23, 27	24,8 \pm 1,5	p>0.05
III	25, 24, 28, 26, 25	25,6 \pm 1,4	p>0.05
IV	27, 27, 24, 27, 28	26,6 \pm 1,4	p>0.05
V	24, 30, 27, 25, 30	27,2 \pm 2,5	p>0.05
VI	17, 19, 19, 21, 20	19,2 \pm 1,3	p<0.005

Beispiel 4

Einfluß der Dreifachkombinationstherapie bestehend aus einer Strahlentherapie am Tag 10, einer Therapie mit Indometacin 4 mg/kg/Tag von Tag 6 bis Tag 11 und der Gabe von Interleukin-2.

Ergebnis

Erst ab einer Strahlendosis von 250 rad war eine signifikante Steigerung der Überlebenszeit der Tiere zu beobachten. Bei 500 und 750 rad Bestrahlung starb keines der Tiere in dem Beobachtungszeitraum von 50 Tagen. Bei diesen Tieren (Gruppe IV und V) war auch bei der Sektion kein Tumor in der Lunge feststellbar. Bei den Tieren, welche mit 1000 rad bestrahlt wurden, konnte nach deren Tod ebenfalls kein Tumor in der Lunge festgestellt werden.

Schlußfolgerung

Durch die Kombinationstherapie von 250 bis 750 rad Bestrahlung mit der Gabe von Indometacin und Interleukin-2 konnte das Überleben der Tiere signifikant verlängert werden.

DE 197 21 211 A 1

Tab. 4a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	Tag 11 bis 17	0	Tag 5 - Tag 11	100000
II	10	Tag 11 bis 17	100 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
III	10	Tag 11 bis 17	250 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
IV	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
V	10	Tag 11 bis 17	750 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	10	Tag 11 bis 17	1000 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000

5

10

15

20

Tab. 4b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	24, 25, 24, 27, 25, 26, 27, 23, 24, 26	25,1 \pm 1,3	
II	23, 25, 27, 24, 27, 23, 26, 25, 26, 24	25,0 \pm 1,4	p>0.05
III	25, 33, 26, 27, 33, 32, 34, 27, 32, 34	30,3 \pm 3,4	p<0.001
IV	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
V	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
VI	15, 19, 19, 21, 20, 17, 22, 16, 18, 15	18,2 \pm 2,3	p<0.001

25

30

35

40

45

50

Beispiel 5

Einfluß des Indometacin-Therapiezeitraumes auf das Therapieergebniss der Dreifachkombination

55

Ergebnis

Die Dreifachkombinationstherapie zeigt nur dann positive Ergebnisse, wenn mit der Indometacintherapie vor der Bestrahlungstherapie begonnen wurde und kein zu großer zeitlicher Abstand zwischen dem Ende der Indometacintherapie und dem Beginn der Strahlentherapie besteht.

60

65

DE 197 21 211 A 1

Tab. 5a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin [4mg/kg/Tag]	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	-	100000
II	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 9	100000
III	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 17	100000
IV	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 10 - Tag 17	100000
V	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 10	100000
VI	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 10 - Tag 17	100000
VII	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 8	100000
VIII	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 4 - Tag 8	100000

Tab. 5b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	25, 25, 24, 26, 25, 24, 27, 24, 23, 26	24,9 \pm 1,1	
II	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
III	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
IV	25, 23, 26, 23, 27, 26, 27, 24, 26, 24	25,1 \pm 1,4	p>0.05
V	24, 24, 26, 26, 25, 26, 27, 23, 26, 25	25,2 \pm 1,2	p>0.05
VI	23, 24, 27, 25, 26, 27, 27, 23, 27, 24	25,3 \pm 1,6	p>0.05
VII	24, 26, 27, 30, 26, 25, 27, 24, 27, 24	26,0 \pm 1,8	p>0.05
VIII	26, 30, 28, 24, 26, 24, 23, 26, 28, 28	26,3 \pm 2,1	p>0.05

Beispiel 6

Einfluß des Interleukin-2 Therapiezeitraumes auf das Therapieergebnis der Dreifachkombinationstherapie

Ergebnis

Wird Interleukin-2 vor Beginn der Strahlentherapie gegeben, so vermindert es die Wirkung der Dreifachkombinationstherapie hochsignifikant (p<0.001). Wird die Dauer der Therapie mit Interleukin-2 vor Beginn der Bestrahlungstherapie verkürzt, so hat dies einen signifikant positiven Einfluß auf das Therapieergebnis (p<0.05). Erst wenn mit der Gabe von Interleukin-2 nach der Bestrahlung begonnen wird, kann sich die Wirkung der Dreifachkombinationstherapie voll entwickeln.

DE 197 21 211 A 1

Tab. 6a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin [4mg/kg/Tag]	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	-	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
II	10	Tag 5 bis 9	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
III	10	Tag 5 bis 10	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
IV	10	Tag 5 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
V	10	Tag 9 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	10	Tag 10 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000

Tab. 6b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	23, 25, 26, 26, 25, 23, 24, 25, 26, 25	24,8 \pm 1,1	
II	24, 26, 25, 26, 27, 25, 24, 23, 23, 26	24,9 \pm 1,3	p>0.05
III	23, 26, 23, 27, 24, 25, 26, 25, 23, 27	24,9 \pm 1,5	p>0.05
IV	30, 33, 34, 30, 35, 34, 30, 26, 32, 35	31,9 \pm 2,7	p<0.01
V	35, 34, 33, 37, 30, 36, 34, 33, 34, 37	34,3 \pm 2,0	p<0.01
VI	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
VI	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001

Beispiel 7

Einfluß des Zeitpunktes der Strahlentherapie auf das Therapieergebnis

Ergebnis

Der Beginn der Strahlentherapie ist für das Therapieergebnis der Dreifachkombinationstherapie unerheblich. Wichtig ist auch bei einem späteren Therapiebeginn, daß vor der Bestrahlung Indometacin gegeben wird und nach der Bestrahlung mit Interleukin-2 behandelt wird.

60

65

DE 197 21 211 A 1

Tab. 7a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin [4mg/kg]	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	Tag 11 bis 17	0	Tag 5 - Tag 11	100000
II	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
III	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 12	Tag 7 - Tag 13	100000
IV	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 15	Tag 5 - Tag 11	100000
V	10	Tag 16 bis 22	500 / Tag 15	Tag 10 - Tag 16	100000
VI	10	Tag 18 bis 24	500 / Tag 17	Tag 12 - Tag 18	100000

Tab. 7b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	25, 23, 26, 24, 27, 26, 23, 27, 26, 25	25,2 \pm 1,4	
II	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
III	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
IV	27, 30, 26, 26, 24, 23, 24, 24, 26, 27	25,7 \pm 2,0	p>0.05
V	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
VI	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001

Beispiel 8

Ersatz von Interleukin-2 (IL-2) durch das unspezifische Immunstimulanz Lipopolysaccharide aus E. coli (LPS).

Ergebnis

Interleukin-2 kann durch LPS ersetzt werden. LPS ist wie Interleukin-2 nur in der Dreifachkombinationstherapie wirksam.

DE 197 21 211 A 1

Tab. 8a

Gruppe	Gruppen- größe	Immunstimul. IL-2 oder LPS Tag 11 bis 17	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin [4mg/kg/Tag]	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	-	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
II	10	IL-2	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
III	10	LPS	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
IV	10	LPS	500 / Tag 10	-	100000
V	10	LPS	-	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	10	LPS	-	-	100000

Tab. 8b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert ± Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	24, 22, 26, 25, 24, 23, 26, 25, 24, 24	24,3 ± 1,2	
II	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p< 0.001
III	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
IV	25, 26, 25, 27, 23, 24, 23, 26, 25, 26	25,0 ± 1,3	p>0.05
V	24, 23, 26, 25, 26, 24, 25, 23, 26, 27	24,9 ± 1,3	p>0.05
VI	24, 25, 23, 24, 26, 27, 24, 23, 26, 25	24,7 ± 1,3	p>0.05

Beispiel 9

Ersatz von Indometacin (Indo.) [4 mg/kg] durch Acetylsalicylsäure (Ass) [20 mg/kg], Diclofenac (Dic.) [2 mg/kg], 50 Dexamethason (Dex.) [1 mg/kg], Piroxicam (Pir.) [1 mg/kg], Naproxen (Nap.) [5 mg/kg] oder Ibuprofen (1 bu.) [10 mg/kg].

Ergebnis

Indometacin kann durch andere antientzündlich wirksame Medikamente ersetzt werden.

DE 197 21 211 A 1

Tab. 9a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Antiphlogistikum: Tag 5 - Tag 11	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	-	100000
II	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Indo.	100000
III	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Ass.	100000
IV	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Dic.	100000
V	10	Tag 11 bis 17	-	Dic.	100000
VI	10	-	500 / Tag 10	Dic.	100000
VII	10	-	-	Dic.	100000
VIII	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Pir.	100000
IX	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Nap.	100000
X	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Ibu.	100000
XI	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Dex.	100000

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 21 211 A 1

Tab. 9b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	23, 25, 25, 26, 23, 24, 26, 27, 26, 25	$25,0 \pm 1,3$	
II	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$
III	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$
IV	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$
V	24, 23, 24, 27, 26, 24, 24, 27, 24, 26	$24,9 \pm 1,3$	$p > 0,05$
VI	26, 23, 25, 26, 26, 24, 25, 26, 23, 27	$25,1 \pm 1,3$	$p > 0,05$
VII	23, 24, 25, 27, 26, 27, 23, 25, 26, 25	$25,1 \pm 1,4$	$p > 0,05$
VIII	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$
IX	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$
X	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$
XI	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	$p < 0,001$

Beispiel 10
Ersatz der Strahlentherapie (Rad.) [500 rad] durch Zytostatikatherapie (Cyclophosphamide (Cyclo.) [5 mg/kg], Doxorubicin (Dox.) [5 mg/kg], Methotrexat (MTX) [20 mg/kg].

Ergebnis
Die Strahlentherapie im Konzept der Dreifachkombinationstherapie kann durch andere Zytostatika ersetzt werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 21 211 A 1

Tab. 10a

Gruppe	Gruppen-größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Zytostatische /Zytotoxische Therapien am Tag 10	Indometacin	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	-	-	-	100000
II	10	Tag 11 bis 17	Rad.	Tag 5 - Tag 11	100000
III	10	Tag 11 bis 17	Cyclo.	Tag 5 - Tag 11	100000
IV	10	Tag 11 bis 17	Cyclo.	-	100000
V	10	-	Cyclo.	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	10	-	Cyclo.	-	100000
VII	10	Tag 11 bis 17	Dox.	Tag 5 - Tag 11	100000
VIII	10	Tag 11 bis 17	MTX	Tag 5 - Tag 11	100000

Tab. 10b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	24, 23, 25, 26, 24, 23, 23, 26, 25, 25	24,4 \pm 1,1	
II	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
III	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
IV	24, 25, 26, 23, 22, 23, 23, 25, 24, 27	24,2 \pm 1,5	p>0.05
V	26, 27, 23, 24, 22, 27, 26, 24, 23, 27	24,9 \pm 1,8	p>0.05
VI	22, 26, 25, 26, 27, 22, 24, 23, 23, 26	24,4 \pm 1,7	p>0.05
VII	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
VIII	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001

Beispiel 11

Ersatz der Strahlentherapie durch Hyperthermie.

Ergebnis

Die Strahlentherapie kann durch die Hyperthermie ersetzt werden.

DE 197 21 211 A 1

Tab. 11a

Gruppe	Gruppengröße	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Hyperthermie 41°C, 30 Min;	Indometacin	Verabreichte Tumorzellzahl (B16-Melanom)
I	10	-	-	-	100000
II	10	-	Tag 10	-	100000
III	10	Tag 11 bis 17	-	-	100000
IV	10	Tag 11 bis 17	Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
V	10	-	-	Tag 5 - Tag 11	100000
VI	10	Tag 11 bis 17	Tag 10	-	100000
VII	10	Tag 11 bis 17	Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
VIII	10	-	Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000

Tab. 11b

Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
I	22, 27, 24, 23, 25, 24, 26, 23, 27, 24	24,5 \pm 1,6	
II	24, 27, 23, 27, 23, 23, 23, 27, 25, 26	24,8 \pm 1,7	p>0.05
III	26, 27, 26, 26, 25, 24, 23, 23, 25, 27	25,2 \pm 1,4	p>0.05
IV	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001
V	24, 27, 22, 26, 25, 26, 24, 23, 23, 26	24,6 \pm 1,6	p>0.05
VI	25, 25, 26, 24, 22, 25, 22, 23, 26, 27	24,5 \pm 1,6	p>0.05
VII	23, 23, 27, 27, 25, 25, 26, 26, 22, 27	25,1 \pm 1,8	p>0.05
VIII	23, 23, 26, 27, 22, 24, 23, 27, 26, 27	24,8 \pm 1,9	p>0.05

Beispiel 12

Übertragbarkeit der im B16 Melanommodell erhaltenen Ergebnisse auf andere Tumoren (MCA-103).

Ergebnis

Das Methylcholantren induzierte Sarcom verhält sich gegenüber der Dreifachkombinationstherapie wie das B 16-Melanom.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tab. 12a

5	Gruppe	Gruppen- größe	Interleukin-2 [2x täglich 100000U/kg]	Strahlentherapie Dosis[rad] / Behandlungszeit	Indometacin	Verabreichte Tumorzellzahl (MCA-105)
10	I	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
15	II	10	Tag 11 bis 17	-	-	100000
20	III	10	-	500 / Tag 10	-	100000
25	IV	10	-	-	Tag 5 - Tag 11	100000
30	V	10	-	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000
35	VI	10	Tag 11 bis 17	-	Tag 5 - Tag 11	100000
40	VII	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	-	100000
45	VIII	10	Tag 11 bis 17	500 / Tag 10	Tag 5 - Tag 11	100000

Tab. 12b

30	Gruppe	Überlebenszeit [Tage]	Überlebenszeit: Mittelwert \pm Standardabweichung	Statistik [T-Test versus Gruppe I]
35	I	30, 27, 29, 32, 33, 29, 28, 27, 33, 30	29,8 \pm 2,1	
40	II	31, 27, 32, 29, 33, 32, 28, 27, 33, 31	30,3 \pm 2,2	p>0.05
45	III	30, 33, 28, 33, 27, 32, 32, 30, 31, 27	30,3 \pm 2,2	p>0.05
50	IV	28, 33, 33, 30, 28, 28, 27, 33, 34, 27	30,1 \pm 2,7	p>0.05
55	V	30, 33, 33, 27, 27, 30, 31, 31, 29, 28	29,9 \pm 2,1	p>0.05
60	VI	33, 28, 32, 27, 32, 32, 27, 28, 33, 31	30,3 \pm 2,4	p>0.05
65	VII	33, 32, 32, 30, 27, 31, 30, 30, 28, 27	30,0 \pm 2,0	p>0.05
70	VIII	>50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50, >50	> 50	p<0.001

Patentansprüche

1. Kombination von antientzündlichen Wirkstoffen mit immunstimulatorischen Agentien und den Tumor schädigenden Agentien (Zytostatika, Chemotherapeutika, physikalische Maßnahmen) zur Behandlung von Tumoren.
2. Kombination von Indometacin mit Interleukin-2 und Doxorubicin zur Behandlung von Tumoren.
3. Kombination von Indometacin (oder Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Diclofenac, Dexamethason, Piroxicam, Naproxen) mit Interleukin-2 (oder LPS) und Doxorubicin (oder Cyclophosphamid, Methotrexat, 7-Strahlung, Hyperthermie) zur Behandlung von Tumoren.
4. Kombination von antientzündlichen Wirkstoffen mit Interleukin-2 (oder LPS) und Doxorubicin (oder Cyclophosphamid, Methotrexat, 7-Strahlung, Hyperthermie) zur Behandlung von Tumoren.
5. Kombination von Indometacin (oder Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Dexamethason, Ibuprofen, Piroxicam, Naproxen) mit immunstimulatorischen Agentien und Doxorubicin (oder Cyclophosphamid, Methotrexat, 7-Strahlung, Hyperthermie) zur Behandlung von Tumoren.
6. Kombination von antientzündlichen Wirkstoffen mit immunstimulatorischen Agentien und Doxorubicin (oder Cyclophosphamid, Methotrexat, γ -Strahlung, Hyperthermie) zur Behandlung von Tumoren.

DE 197 21 211 A 1

7. Kombination von Indometacin (oder Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Dexamethason, Ibuprofen, Piroxicam, Naproxen) mit immunstimulatorischen Agentien und den Tumor schädigenden Agentien (Zytostatika, Chemotherapeutika, physikalische Maßnahmen) zur Behandlung von Tumoren.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

WPIL - ©Thomson Derwent

AN

1999-010605 [02]

XA

C1999-003690

TI

Three-fold treatment of tumours providing synergistic effect - comprises administration of immunostimulant e.g.

interleukin-2, anti-cancer treatment (e.g. cytostatic agent or irradiation) and antiinflammatory compound, e.g.

indomethacin

DC

B05

PA

(LIND/) LINDNER W

IN

LINDNER W

NP

1

NC

1

PN

DE19721211 A1 19981126 DW1999-02 A61K-045/06 19p *

AP: 1997DE-1021211 19970521

PR

1997DE-1021211 19970521

IC

A61K-045/06 A61K-031/40 A61K-031/70 A61K-051/00

AB

DE19721211 A

A combination of antiinflammatory and immunostimulant agents along with anticancer compounds (cytostatic or

chemotherapeutic agents or physical techniques) is claimed for treatment of tumours.

USE - The method is useful for the treatment of tumours (no further details given).

ADVANTAGE - It is known to treat tumours with immunostimulants, or with a combination of immunostimulants and

surgery, chemotherapeutic agents or radiation. Additional treatment with antiphlogistic agents results in a synergistic

effect, allowing lower doses of radiation to be administered, leading to fewer side effects.

(Dwg.0/0)

MC

CPI: B02-S B04-H02B B06-D01 B06-D09 B10-C04C B14-C03 B14-H01

UP

1999-02